



УДК 639.3.09

Поступила в редакцию 27.10.2022

<https://doi.org/10.47612/978-985-880-000000-0-2022-38-292-313>

Received 27.10.2022

Е.В. Максимьюк

*РУП «Институт рыбного хозяйства» РУП «Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси по животноводству», Минск, Беларусь*

АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОФЛОРЫ ОСЕТРОВЫХ ВИДОВ РЫБ К АНТИБИОТИКАМ, РАЗРЕШЕННЫМ К ПРИМЕНЕНИЮ В РЫБОВОДСТВЕ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Аннотация: В статье представлены результаты анализа чувствительности микрофлоры осетровых видов рыб к таким антибиотикам, как энрофлоксацин, неомицин, цiproфлоксацин, левофлоксацин и рифампицин. Получены данные об антибиотикочувствительности 81 штамма, изолированного из различного биологического материала рыб с клиническими проявлениями инфекционного процесса и без патологий. Все полученные результаты по зонам задержки роста бактериальной культуры (мм) ранжированы по степени чувствительности. Установлено, что палочковидные бактерии незначительно, но всё же более чувствительны к действию фторхинолонов и неомицину, по сравнению с кокками. Однако к рифампицину отмечена устойчивость 69,1 % исследуемых палочковидных бактерий (в том числе 75,5 % от всех исследуемых грамотрицательных палочек, чаще других являющихся условно-патогенными для рыб), в то время как, только 19,2 % кокков показали устойчивость к данному препарату.

Ключевые слова: микрофлора, антибиотикочувствительность, резистентность, зона задержки роста

E. Maksimyyuk

*RUE “Fish Industry Institute” of the RUE “Scientific and Practical Center of Belarus
National Academy of Sciences for Animal Husbandry”, Minsk, Belarus*

ANALYSIS OF THE SENSITIVITY OF THE MICROFLORA OF STURGEON SPECIES TO ANTIBIOTICS ALLOWED FOR USE IN FISH FARMING IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Abstract: The article presents the results of the analysis of the sensitivity of the microflora of sturgeon fish species to such antibiotics as enrofloxacin,



neomycin, ciprofloxacin, levofloxacin and rifampicin. Data were obtained on the antibiotic sensitivity of 81 strains isolated from various biological material of fish with clinical manifestations of the infectious process and without pathologies. All the results obtained for the zones of growth inhibition of the bacterial culture (mm) are ranked according to the degree of sensitivity. It has been established that rod-shaped bacteria are slightly more sensitive to the action of fluoroquinolones and neomycin, compared with cocci. However, 69.1 % of the studied rod-shaped bacteria were found to be resistant to rifampicin (including 75.5 % of all studied gramnegative rods that are conditionally pathogenic for fish), while only 19.2 % of cocci showed resistance to this drug.

Keywords: microflora, antibiotic susceptibility, resistance, growth retardation zone.

Введение. Водные объекты постоянно находятся в окружении микроорганизмов, которые способны проникать в них, ассоциироваться или находиться некоторое время в тканях и органах, не принося вреда. Они постоянно присутствуют в желудочно-кишечном тракте, откуда при определенных условиях могут быстро проникать во внутренние ткани и органы и активно размножаться. Постоянное присутствие в водной среде патогенной и условно-патогенной микрофлоры представляет собой скрытый очаг бактериальных инфекций, который способен быстро реализоваться в виде вспышек массовых заболеваний среди культивируемых объектов. Вспышки бактериальных заболеваний нередко приводят к высокой смертности поголовья рыб, трудно поддаются локализации при проведении лечебно-профилактических мероприятий, поэтому являются наиболее экономически значимым препятствием для развития аквакультуры [1].

Бактериальные болезни вызываются возбудителями, являющимися как строгими (облигатными) патогенами для рыб, которые не могут длительное время выживать в воде в отсутствие восприимчивого хозяина — рыбы, так и бактериями, являющимися условными патогенами, которые обнаруживаются в почве и воде. Последние становятся вирулентными при определенных условиях и поражают рыб при снижении уровня резистентности в следствие переуплотнения посадки, некачественного корма, хендлинга, заражения паразитами, низкого содержания кислорода, неблагоприятных температур или pH, накопления продуктов метаболизма. Все перечисленные факторы снижают устойчивость организма рыб к возбудителям.



В качестве патогенных и условно-патогенных бактерий у рыб согласно Определителю бактерий Берджи, встречаются представители группы 4, родов *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*; группы 5, подгруппы 1, сем. *Enterobacteriaceae*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia*; подгруппы 2, сем. *Vibrionaceae* родов *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*; группы 15, подгруппы 1, родов *Cytophaga*, *Flexibacter* и некоторые другие [2].

Инфекционные заболевания относятся к наиболее опасным болезням рыб и сопровождаются большими потерями рыбопродукции. Данная проблема существует не только в Республике Беларусь, но и в других странах, занимающихся аквакультурой. Поэтому защита рыб от бактериальных заболеваний является актуальным вопросом ихтиопатологической науки [3–6].

В последние годы все чаще у рыб возникают смешанные инфекции, обусловленные ассоциацией микроорганизмов, что осложняет не только диагностику заболевания, но и разработку эффективных мер лечения. Основной проблемой ихтиопатологии последних лет является широкое распространение резистентных форм условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и снижение эффективности ряда антибиотиков. Заражение возбудителями, имеющими множественную устойчивость к антибиотикам, приводит к тому, что заболевание протекает в более тяжелой форме, нередко со смертельным исходом, а борьба с подобными болезнями обходится значительно дороже.

Игнорирование вопросов, связанных с возникновением резистентных форм этиологических агентов бактериальных болезней рыб, рано или поздно приведёт рыбоводное хозяйство к большим проблемам. Для того, чтобы избежать их, необходимо проводить регулярный микробиологический контроль уровня чувствительности выделяемых возбудителей к применяемым антибиотикам. Это поможет рационализировать применение антибиотиков при бактериальных заболеваниях рыб.

Однако, избежать применения антибактериальных средств, в т.ч. антибиотиков зачастую не представляется возможным. Известно, что химиопрепараты имеют свойство накапливаться (аккумулироваться) в тканях рыбы. Кумулятивное действие лекарственных препаратов может вызвать патологические изменения в рыбе и нанести вред здоровью человека.

Использование антибиотиков в аквакультуре с позиций безопасности пищевых продуктов становится все большей проблемой для сельско-



го хозяйства и здравоохранения во всем мире. В современном товарном выращивании объектов аквакультуры антибиотики применяются не только в терапевтических целях, но и для профилактики заболеваний, а также в качестве стимуляторов роста. В связи с этим большое количество здоровых водных животных систематически или часто получают антибиотики. С продукцией аквакультуры в организм человека, а также с отходами производства в окружающую среду антибиотики поступают в концентрациях, вызывающих нарушения физиологических процессов в макроорганизмах, микробный дисбаланс, возникновение, распространение и сохранение резистентных бактерий, которые вызывают массовые инфекционные заболевания у животных и человека. В связи с использованием во многих странах мира антибиотиков в аквакультуре и большими масштабами международной торговли ее продукцией устойчивость бактерий в мире прогрессирует, что может привести к состоянию, приближенному к доантибиотиковому периоду.

Гибель или стабилизация развития возбудителя инфекционного заболевания возможны только при условии наличия его чувствительности к применяемому антибиотику. Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам — это свойство микроорганизмов реагировать на действие препаратов приостановкой размножения или гибелью. Каждый вид бактерий или близкая группа видов имеют характерный спектр и уровень природной чувствительности по отношению к определенному или группе антибиотиков. Мерой чувствительности бактерий является минимальная концентрация антибиотика (мкг, ЕД), которая подавляет рост микробов на питательных средах в стандартных условиях постановки опыта.

В результате широкого использования антибиотиков бактерии эволюционировали и приобретали устойчивость к их действию (*antibioticresistance*), поэтому многие вещества, ранее угнетавшие развитие определенных видов микробов, больше не оказывают желаемого эффекта. Паспортизированный (установленный при разработке препарата) спектр антимикробной эффективности каждого антибиотика со временем в процессе его широкой эксплуатации существенно изменяется. Использование таких малоэффективных антибиотических препаратов в медицине, сельском хозяйстве и аквакультуре привело к появлению в природе и среди патогенных микроорганизмов множественных антибиотикоустойчивых видов, некоторые из них даже приобрели способность размножаться в присутствии антибиотиков.



Для получения наиболее эффективного лечения и профилактики бактериальных болезней необходимо установить фактическую чувствительность возбудителя. Чаще всего это невозможно осуществить, так как в первую очередь необходимы правильная постановка диагноза болезни, выделение возбудителя в чистом виде и определение его чувствительности. Поэтому при производстве антибиотиков, как правило, устанавливается чувствительность к ним различных видов бактерий и в инструкции по их применению приводятся антибиотикограммы, с учетом которых необходимо применять препараты в качестве лечебных или профилактических средств [1].

Неправильно выбранный антибиотик, губительно действуя на один вид бактерий, способствует размножению другого условно-патогенного штамма, что может вызвать рецидив болезни после временной ремиссии. Поэтому для более эффективного применения препаратов обязательно следует проводить определение к ним чувствительности доминирующих в данной патологии штаммов бактерий, а после антибиотикотерапии целесообразно провести курс скармливания комплекса витаминов или пробиотика для повышения иммунно-физиологического статуса и ускорения выздоровления рыб [7].

Широкое применение антибиотиков и химиопрепаратов для профилактики и борьбы с бактериальными болезнями в рыбоводных хозяйствах привело к возникновению таких проблем, как лекарственная сопротивляемость, накопление антибиотиков и химиопрепаратов в тканях и иммуносупрессия. Если антибиотики используются в самых низких возможных дозах, по экономическим причинам, а также с целью избежать побочных эффектов и снизить воздействие на окружающую среду, сопротивление патогенов к действию антибиотиков увеличивается. В последние годы использование некоторых антибиотиков было запрещено в ряде стран вследствие серьезной экологической опасности, а также некоторого канцерогенного эффекта, вызываемого ими у многих видов рыб. Кроме того, антибиотики могут вызвать угнетение полезной микрофлоры, которая обычно присутствует в пищеварительном тракте рыб.

В связи с этим в настоящее время применение антибиотиков должно идти по рациональному пути и под строгим контролем антибиотикочувствительности патогенной и условно-патогенной микрофлоры, выделяемой от рыб.



Цель работы — определить и проанализировать чувствительность микрофлоры осетровых видов рыб к антибиотикам, применяемым в рыбном хозяйстве на территории Беларуси.

Материалы и методы. Материал для исследования взят в рыбоводных организациях Республики Беларусь в 2020–2022 гг. Было отобрано 175 проб биологического материала (печень, почки, селезенка, кровь, содержимое язв, экссудат, икра). Исследование антибиотичувствительности проводили для 81 изолята микроорганизмов.

Посевы из внутренних органов, крови, содержимого язв, икры, экссудата (при его наличии) рыб производили по классической методике на твердую питательную среду (мясопептонный агар — МПА). После инкубирования посевов в термостате при 30–32 °С в течение 24–48 ч изучали их морфологию. Видовую принадлежность бактерий определяли при помощи определителя Берджи [8], тест-систем Api 20 E, Api Staph, Api Strep и теста на оксидазную активность (OXI-test, Lachema). Дальнейшие микробиологические исследования проводили по общепринятым методикам [9–13].

Чувствительность выделенных штаммов к антибиотикам исследовали стандартным диско-диффузионным методом. Для этого использовали набор дисков НД-ПМП-1 (ципрофлоксацин, неомицин, левофлоксацин, энрофлоксацин, рифампицин) предназначенный для определения чувствительности возбудителей разных заболеваний, выделенных из патологического материала, к различным противомикробным препаратам, применяемым для лечения.

Метод основан на определении диаметра зоны подавления роста культур при воздействии соответствующего противомикробного препарата. Определение проводили после посева испытуемых штаммов на мясопептонный агар, на поверхность которого наносили различные диски с соответствующими противомикробными лекарственными средствами. Диаметр зоны учитывали по полному подавлению роста микроорганизмов, определяемому визуально. Диаметры зон измеряли с точностью до 1 мм при помощи линейки.

Инокулят готовили из чистой 20-часовой культуры бактерий, выросшей на поверхности плотной питательной среды. Для этого 4–5 изолированных колоний суспендировали в жидкой питательной среде или физиологическом растворе. Концентрацию суспензии из агаровой культуры устанавливали по стандарту мутности 0,5 по Мак Фарланду, соответствующему $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.



Инокулят сразу после приготовления наносили на поверхность агаровой среды стерильной пипеткой для переноса жидкостей, поворачивая чашку Петри на 60°, чтобы получить как можно более равномерный газон. Чашки с нанесенным инокулятом оставляли при комнатной температуре (+ 18–25 °С) на 15 мин для абсорбции инокулята.

Диски с помощью пинцета накладывали на поверхность зараженной питательной среды не позднее, чем через 15 мин после инокуляции на одинаковом расстоянии один от другого (~30 мм) и на расстоянии ~20 мм от края чашки. На одну чашку помещали 5 дисков, пропитанных различными антибиотиками. Инкубировали чашки с культурой и дисками в течение 18–24 ч при температуре +32–35 °С перевернутыми кверху дном. Оценку результатов проводили по табл. 1, которые содержат пограничные значения диаметров зон подавления роста для устойчивых, промежуточных и чувствительных штаммов.

Таблица 1. Интерпретация значений диаметров зон подавления роста при определении чувствительности к противомикробным препаратам микроорганизмов с обычными питательными потребностями

Table 1. Interpretation of inhibition zone diameters for antimicrobial susceptibility testing of microorganisms with normal nutritional requirements

Наименование дисков с препаратами	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметры зон для культур, мм		
		Устойчивых	Промежуточных	Чувствительных
Левифлоксацин	5	≤13	14–16	≥17
Неомицин	30	≤12	13–16	≥17
Офлоксацин	5	≤12	13–15	≥16
Рифампицин	5	≤16	17–19	≥20
Ципрофлоксацин	5	≤15	16–20	≥21
Энрофлоксацин	5	≤17	18–21	≥22

Результаты и обсуждение. Для борьбы с бактериальными инфекциями рыб широко применяются классические антибиотики. В Республике Беларусь разрешены для использования в рыбоводных организациях такие препараты, как: неомицин, энрофлоксацин, левофлоксацин, рифампицин, ципрофлоксацин. Необходим постоянный мониторинг чувствительности этиологических агентов бактериальных болезней рыб к применяемым антибиотикам, в связи с тем, что эффективность указанных препаратов со временем снижается, в следствие появления резистентных форм возбудителей.



Проведено исследование антибиотикочувствительности 81 штамма бактерий, из которых 55 представители палочковидной микрофлоры, 26 — кокки. Результаты исследования антибиотикочувствительности выделенных микроорганизмов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Чувствительность исследуемых штаммов микроорганизмов к антибиотикам

Table 2. Sensitivity of the studied strains of microorganisms to antibiotics

№	Морфология бактерий, видовая принадлежность (для идентифицированных)	Чувствительность, зона задержки роста (мм)				
		Энр ¹	Цип ²	Нео ³	Лфц ⁴	Риф ⁵
1	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Vibrio vulnificus</i>)	29–30	29–32	21–22	33–34	16–17
2	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	24–26	30–32	20–22	27	10–11
3	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки (<i>Yersinia ruckeri</i>)	28–29	30–32	18–20	26–30	10–11
4	грамотрицательные палочки	28–29	30–32	18–20	26–30	10–11
5	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки	23	25	20	27	17
6	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Vibrio fluvialis</i>)	28–29	30–31	18–20	28–30	15
7	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки	29–30	34	12–13	32–36	18–20
8	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки	30	30–32	18–20	28–32	10–11
9	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки	26–38	28–40	н/и	26–34	9–10
10	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas salmonicida</i>)	28–30	28–30	23–24	30	9
11	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	41	47	33–34	48	20–21
12	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Rhizobium radiobacter</i>)	30–32	32	20–22	32	9–10



Продолжение табл. 2

№	Морфология бактерий, видовая принадлежность (для идентифицированных)	Чувствительность, зона задержки роста (мм)				
		Энр ¹	Цип ²	Нео ³	Лфц ⁴	Риф ⁵
13	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	32–34	30–36	22–24	30–36	10–11
14	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	24–26	26–28	24–26	30–32	19–20
15	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Non-fermenter spp.</i>)	41	35	34	40	45
16	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)	38	34	18	38	16
17	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки	32	40	26	34	0
18	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки	28	27	22	30	20
19	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas finlandensis</i>)	36	34	20	32	18
20	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки (<i>Lelliottia amnigena</i>)	26	36	25	32	10
21	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	32–34	32–34	20–21	34–35	14–15
22	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки	28–30	33–35	22–23	32–34	9–10
23	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки	21	24	28	28	13
24	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas veronii</i>)	32	33–34	16–20	31–33	14–15
25	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Plesiomonas shigelloides</i>)	28	28	22	28–30	11



Продолжение табл. 2

№	Морфология бактерий, видовая принадлежность (для идентифицированных)	Чувствительность, зона задержки роста (мм)				
		Энр ¹	Цип ²	Нео ³	Лфц ⁴	Риф ⁵
26	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Plesiomonas shigelloides</i>)	20	27	20	27	11
27	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas veronii</i>)	15–30	20–31	20–22	21–31	12–13
28	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Plesiomonas shigelloides</i>)	20–21	25–30	25–26	30	0
29	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas veronii</i>)	16–17	19–20	23–24	21–22	14
30	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки	14–15	16	24–26	19–20	0
31	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки (<i>Enterobacter cloacae</i>)	21–23	23–24	20	21–22	0
32	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Kluyvera sp.</i>)	24–25	29–30	20	29–30	0
33	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки (<i>Citrobacter freundii</i>)	30–31	26–29	21–22	33–34	0
34	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Plesiomonas shigelloides</i>)	32	41	24	39	12
35	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки (<i>Salmonella sp</i>)	0	19–20	22–23	13	0
36	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	21–22	24–25	н/и	26–27	10
37	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas veronii</i>)	14–15	24–25	н/и	22–23	18–19



Продолжение табл. 2

№	Морфология бактерий, видовая принадлежность (для идентифицированных)	Чувствительность, зона задержки роста (мм)				
		Энр ¹	Цип ²	Нео ³	Лфл ⁴	Риф ⁵
38	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Shewanella putrefaciens</i>)	29–30	33–34	н/и	32–33	20–21
39	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	34–36	40–42	н/и	42–44	15–16
40	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	24	26	20	25	11
41	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	20	28	19	25	11
42	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Chryseobacterium indologenes</i>)	32	36	26	34	35
43	Оксидазоотрицательные грамотрицательные палочки (<i>Citrobacter braakii</i>)	28	34	22	32	9
44	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	24	16	22	24	15
45	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Vibrio fluvialis</i>)	0	0	27	0	15
46	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas veronii</i>)	27	33	35	30	42
47	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	22	26	22	28	22
48	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Pseudomonas synxantha</i>)	26–28	36	24–26	34–36	0
49	Оксидазоотрицательные грамположительные палочки	30	30	24	35	34



Продолжение табл. 2

№	Морфология бактерий, видовая принадлежность (для идентифицированных)	Чувствительность, зона задержки роста (мм)				
		Энр ¹	Цип ²	Нео ³	Лфц ⁴	Риф ⁵
50	Оксидазоположительные грамположительные палочки (<i>Bacillus safensis</i>)	40	42	30	40	38
51	Оксидазоотрицательные грамположительные палочки	26	28	26	28	30
52	Оксидазоположительные грамположительные палочки	35–37	34–37	н/и	34–37	18
53	Оксидазоположительные грамположительные палочки	32–33	34–35	н/и	32–33	9
54	Оксидазоположительные грамположительные палочки	24	25	25	24	28
55	Оксидазоположительные грамотрицательные палочки (<i>Pseudomonas japonica</i>)	21–22	22–24	24	23	9
56	Оксидазоотрицательные грамотрицательные кокки	22–25	28–30	17–19	32	34–35
57	Оксидазоположительные грамотрицательные кокки	22–23	23–25	22–24	25–26	34
58	Оксидазоположительные грамотрицательные кокки	12–13	17–18	25–27	13–14	25–27
59	Оксидазоположительные грамположительные кокки (<i>Staphylococcus aureus</i>)	24	22	15	22	26
60	Оксидазоотрицательные грамотрицательные кокки	23–24	20–21	21–22	24–25	27–28
61	Оксидазоположительные грамположительные кокки (<i>Lactococcus garveae</i>)	15	18	23	18–20	15
62	Оксидазоположительные грамположительные кокки (<i>Staphylococcus caprae</i>)	24–25	26–27	н/и	27–28	16
63	Оксидазоположительные грамотрицательные кокки	23	24	22	24	0
64	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Micrococcus sp.</i>)	32	33	22	28	18



Продолжение табл. 2

№	Морфология бактерий, видовая принадлежность (для идентифицированных)	Чувствительность, зона задержки роста (мм)				
		Энр ¹	Цип ²	Нео ³	Лфц ⁴	Риф ⁵
65	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Staphylococcus warneri</i>)	28–30	33	н/и	34–36	34–36
66	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Micrococcus sp.</i>)	25–27	30–33	27	28–29	10
67	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки	28	26	24	26	20
68	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки	28	30	24	28	24
69	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Aerococcus viridans</i>)	26	26	18	26	20
70	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Aerococcus sp.</i>)	10	13	18	12	21
71	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Aerococcus urinae</i>)	21–24	29–30	н/и	28–29	19–20
72	Оксидазоположительные грамположительные кокки	17–18	22	н/и	22	30–31
73	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Lactococcus lactis</i>)	30	22	28	28	15
74	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Granulicatella adiacens</i>)	18	15	25	18	20
75	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Leuconostoc sp.</i>)	22	24	26	22	30
76	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Leuconostoc sp.</i>)	24	23	28	25	32
77	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Staphylococcus warneri</i>)	28–29	33	н/и	30–32	33–35



Окончание табл. 2

№	Морфология бактерий, видовая принадлежность (для идентифицированных)	Чувствительность, зона задержки роста (мм)				
		Энр ¹	Цип ²	Нео ³	Лфц ⁴	Риф ⁵
78	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Aerococcus viridans</i>)	32–34	35–36	н/и	37–38	36
79	Оксидазоположительные грамположительные кокки (<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i>)	26–29	34	н/и	34	31–33
80	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Staphylococcus lentus</i>)	28	25	20	26	30
81	Оксидазоотрицательные грамположительные кокки (<i>Kocuria kristinae</i>)	30	26	28	28	32

Примечание. 1 — энрофлоксацин, 2 — ципрофлоксацин, 3 — неомицин, 4 — левофлоксацин, 5 — рифампицин, н/и — не исследовали

Как видно из табл. 2, чаще всего количественные показатели (мм зоны задержки роста) антибиотикочувствительности имеют определенные тенденции в зависимости от морфологии бактерии и ее видовой принадлежности. Так, оксидазоположительные грамотрицательные условно-патогенные палочки р. *Aeromonas* и *Vibrio*, показывают высокую/среднюю чувствительность к антибиотикам фторхинолонового ряда, таким как ципрофлоксацин, энрофлоксацин, левофлоксацин, и неомицину. Однако условно-патогенные бактерии р. *Pseudomonas* чаще высокочувствительны к неомицину и среднечувствительны к фторхинолонам. Микроорганизмы указанных родов имели промежуточную чувствительность либо устойчивость к антибиотику рифампицин.

Так же в ходе выполнения исследований некоторые штаммы палочковидных бактерий показывали не свойственную антибиотикочувствительность с абсолютным отсутствием зон задержки роста, т.е. устойчивость к одному или нескольким антибактериальным препаратам. Это явление возможно в следствие нерациональной антибиотикотерапии, т.е. лечением бактериальной инфекции рыб одним (в некоторых случаях несколькими) антибиотиком без исследования чувствительности возбудителей к применяемым препаратам, что является одной из глав-



ных причин возникновения множественной устойчивости этиологических агентов бактериальных болезней рыб к антибиотикам.

По результатам исследований, представленным в табл. 2 видно, что 11 штаммов палочковидных бактерий имели высокую чувствительность ко всем исследуемым антибиотикам. Среди них было три штамма аэромонад (два штамма *Aeromonas hydrophila* и один штамм *Aeromonas veronii*), *Shewanella putrefaciens*, *Chryseobacterium indologenes*, *Bacillus safensis*, и 5 штаммов палочек разной оксидазной активности и грампринадлежности. Наряду с этим 35 штаммов исследуемых палочковидных бактерий имели показатели устойчивости по одному антибиотику (в 97 % (34 штамма) случаев к рифампицину, 3 % — к неомецину). Два штамма оксидазоположительных грамотрицательных палочек, один из которых *Aeromonas veronii*, показали устойчивость одновременно к двум препаратам: рифампицин и энрофлоксацин. Бактерии р. *Salmonella* (сомнительный профиль идентификации) показали устойчивость к трем препаратам: рифампицин, энрофлоксацин и левофлоксацин. Один штамм оксидазоположительных грамотрицательных палочек имел чувствительность только к неомецину и оказался устойчив к действию рифампицина, левофлоксацина, ципрофлоксацина и энрофлоксацина.

Представители кокковой микрофлоры имели отличающиеся от палочек показатели чувствительности. Так, 13 штаммов (50 % от всех исследуемых кокков), включая кокки различной оксидазной активности и грампринадлежности среди которых были *Staphylococcus warneri*, *Aerococcus viridans*, *Leuconostoc sp.*, *Staphylococcus cohnii cohnii*, *Staphylococcus lentus*, *Kocuria kristinae*, показали высокую чувствительность ко всем исследуемым антибиотикам. У пяти штаммов кокков таких, как *Staphylococcus caprae*, *Micrococcus sp.*, *Lactococcus lactis*, наблюдалась устойчивость к одному антибиотику (у 80 % — к рифампицину, 20 % — к ципрофлоксацину), у двух штаммов кокков разной грампринадлежности, один из которых *Lactococcus garveae*, наблюдалась устойчивость к двум антибиотикам (энрофлоксацин/левофлоксацин, энрофлоксацин/рифампицин). У одного штамма *Aerococcus sp.* наблюдалась устойчивость к энрофлоксацину, ципрофлоксацину и левофлоксацину (антибиотики фторхинолового ряда).

Для оценки общего уровня чувствительности все исследуемые бактерии были разделены на группы: грамотрицательные палочки (49 штаммов), грамположительные палочки (6 штаммов), бактерии р.



Aeromonas (17 штаммов, входят в группу грамотрицательных палочек и вынесены также отдельной группой как наиболее часто встречаемые бактерии в биологических пробах от рыб), группа палочковидных бактерий (55 штаммов, включает результаты чувствительности грамотрицательных и грамположительных палочек), грамположительные кокки (21 штамм), грамотрицательные кокки (5 штаммов), кокки (26 штаммов, включает результаты чувствительности грамотрицательных и грамположительных кокков). Следует отметить, что этиологическими агентами бактериальных болезней являются грамотрицательные палочки и грамположительные кокки. Положительные по Граму палочки, как и отрицательные по Граму кокки являются нормальной микрофлорой и реже выделяются при микробиологических исследованиях. Однако их антибиотикочувствительность была также проанализирована, чтобы показать, как ведет себя нормальная микрофлора при воздействии того или иного препарата на условно-патогенные и патогенные штаммы микроорганизмов.

В табл. 3 представлен результат (%) антибиотикочувствительности по ранжированию размеров зон задержки роста бактерий по каждой группе микроорганизмов. Уровень чувствительности интерпретировали в соответствии с табл. 1 и рассчитывали процентное соотношение штаммов группы, имеющих чувствительность (высокую), промежуточную чувствительность (среднюю), устойчивость к каждому из исследуемых антибиотиков.

По результатам ранжирования можно сделать вывод о том, что все исследуемые бактерии р. *Aeromonas* чувствительны к неомицину и левофлоксацину, 94,1 % аэромонад чувствителен также к ципрофлоксацину, 76,5 % — к энрофлоксацину. К рифампицину устойчивы 64,7 % бактерий р. *Aeromonas*, что указывает на тенденцию снижения чувствительности к данному препарату и он редко является препаратом выбора в борьбе с инфекционными болезнями, вызванными аэромонадами. Группа грамотрицательных палочек, в структуре которых также находятся аэромонады, показала еще большую устойчивость к рифампицину, которая составила 75,5 %, т.е. среди исследуемых грамотрицательных палочек 75,5 % показали устойчивость к данному препарату. Уровень чувствительности грамположительных палочек характеризовался как высокий по всем антибиотикам, кроме рифампицина (66,7 %), и составил 100 % к энрофлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину и неомицину. Показатель устойчивости к рифампицину, по сравне-



нию с грамотрицательными палочками, имеет более низкое значение и составил 16,65 % от всех исследуемых грамположительных палочек.

Таблица 3. Антибиотикочувствительность бактерий по ранжированию размера зоны задержки роста
Table 3. Antibiotic sensitivity of bacteria by ranking the size of the zone of growth inhibition

Группа микроорганизмов	Уровень чувствительности	Показатель чувствительности группы, %				
		Энр	Цип	Нео	Лфц	Риф
Бактерии рода <i>Aeromonas</i>	Чувствительные	76,5	94,1	100	100	17,65
	Промежуточные	11,75	5,9	0	0	17,65
	Резистентные	11,75	0	0	0	64,7
Грамотрицательные палочки	Чувствительные	77,6	89,7	97,7	95,9	14,3
	Промежуточные	12,2	8,1	0	0	10,2
	Резистентные	10,2	2	2,3	4,1	75,5
Грамположительные палочки	Чувствительные	100	100	100	100	66,7
	Промежуточные	0	0	0	0	16,65
	Резистентные	0	0	0	0	16,65
Палочковидные бактерии	Чувствительные	80	90,9	98	96,4	20
	Промежуточные	10,9	7,3	0	0	10,9
	Резистентные	9,1	1,8	2	3,6	69,1
Грамотрицательные кокки	Чувствительные	80	60	100	80	80
	Промежуточные	0	40	0	0	0
	Резистентные	20	0	0	20	20
Грамположительные кокки	Чувствительные	85,7	85,7	94,1	95,3	71,2
	Промежуточные	4,7	4,7	5,9	0	9,6
	Резистентные	9,6	9,6	0	4,7	19,2
Кокки	Чувствительные	84,6	80,75	94,8	92,3	73,1
	Промежуточные	3,85	11,55	5,2	0	7,7
	Резистентные	11,55	7,7	0	7,7	19,2

Примечание. Данные в таблице приведены в % соотношении от всех исследуемых штаммов в каждой группе микроорганизмов.

Из 55 штаммов палочковидных бактерий 80 % были чувствительны к энрофлоксацину, 90,9 % — к ципрофлоксацину, 96,4 % — к левофлоксацину, 98 % — к неомицину, 20 % — к рифампицину. Промежуточная чувствительность была на уровне 10,9 % — к энрофлоксацину и рифампицину, 7,3 % — к ципрофлоксацину. Отсутствие чувствительности



наблюдалось у 9,1 % штаммов к энрофлоксацину, 1,8 % — к ципрофлоксацину, 2 % — к неомицину, 3,6 % — к левофлоксацину, 69,1 % — к рифампицину.

По результатам ранжирования уровня чувствительности кокковой микрофлоры установлено, что антибиотикочувствительность грамотрицательных и грамположительных групп кокков имеет некоторые отличия. Чувствительность к энрофлоксацину составила от 80 % у грамотрицательных кокков до 85,7 % у грамположительных кокков, к ципрофлоксацину — от 60 % у грамотрицательных кокков до 85,7 % у грамположительных кокков, к неомицину — от 94,1 % у грамположительных кокков до 100 % у грамотрицательных кокков, к левофлоксацину — от 80 % у грамотрицательных кокков до 95,3 % у грамположительных кокков, к рифампицину — от 71,2 % у грамположительных кокков до 80 % у грамотрицательных кокков. У представителей кокковой микрофлоры не наблюдалось высоких показателей устойчивости к рифампицину, в сравнении с палочковидными бактериями.

Из 26 штаммов кокков 84,6 % были чувствительны к энрофлоксацину, 80,75 % — к ципрофлоксацину, 92,3 % — к левофлоксацину, 94,8 % — к неомицину. Промежуточная чувствительность была на уровне 3,85 % к энрофлоксацину, 7,7 % — к рифампицину, 11,55 % — к ципрофлоксацину, 5,2 % — к неомицину. Отсутствие чувствительности наблюдалось у 11,55 % штаммов к энрофлоксацину, 7,7 % — к ципрофлоксацину, 7,7 % — к левофлоксацину, 19,2 % — к рифампицину.

Выводы. Исследована чувствительность 81 штамма микроорганизмов (55 штаммов палочковидных бактерий и 26 штаммов кокков) к 5 антимикробным препаратам. Все исследуемые микроорганизмы разделены на группы по морфологическим и тинкториальным признакам. Количественные результаты зон задержек роста бактериальной культуры интерпретированы и ранжированы по степени чувствительности. В результате анализа полученных данных отмечено, что из группы палочковидных бактерий 80 % были чувствительны к энрофлоксацину, 90,9 % — к ципрофлоксацину, 96,4 % — к левофлоксацину, 98 % — к неомицину. Что указывает на высокую чувствительность палочковой флоры к данным препаратам, следовательно, они чаще всего становятся препаратами выбора при терапии инфекционных заболеваний. Однако, отмечены случаи приобретения устойчивости грамотрицательных палочек, в частности бактерий р. *Aeromonas*, к фторхинолонам при неоднократном бесконтрольном их применении без определения чувс-



твительности возбудителя к антибиотикам. Также отмечено возникновение устойчивости исследуемых палочковидных бактерий к рифампицину на уровне 69,1 %. Из группы кокков 84,6 % были чувствительны к энрофлоксацину, 80,75 % — к ципрофлоксацину, 94,8 % — к неомицину, 92,3 % — к левофлоксацину, 73,1 % — к рифампицину. Устойчивость палочковой микрофлоры и кокков к энрофлоксацину находилась примерно на одном уровне и составила 9,1 % и 11,55 % соответственно. А также наблюдалась устойчивость 7,7 % кокков к ципрофлоксацину и левофлоксацину.

При сравнении чувствительности условно—патогенных грамотрицательных палочек р. *Aeromonas* и представителей нормальной микрофлоры (грамположительные палочки и грамотрицательные кокки), можно сделать вывод о совпадении профилей чувствительности по нескольким антибиотикам, которые чаще всего применяются для лечения аэромоноза (фторхинолоны), т.е. данные препараты угнетают рост и патогенной и нормальной микрофлоры. В случае применения рифампицина, чаще всего, рост нормальной микрофлоры будет подавлен больше, чем рост возбудителя бактериоза. Следовательно, применение не подходящего по степени чувствительности патогенной микрофлоры антибиотика, может нанести существенный вред организму рыбы.

Таким образом, исследование чувствительности бактериальных культур, выделенных из биологического материала рыб имеет важное значение в терапии инфекционных заболеваний. Анализ антибиотикочувствительности является ключевым аспектом применения антибиотиков и снижения нерациональной антибиотической нагрузки на микрофлору рыб, что в последующем поможет предотвратить появление бактерий с множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам.

Список использованных источников

1. Скурат, Э. К. Пробиотики для профилактики бактериальных инфекций у рыб / Э. К. Скурат, В. А. Сиволоцкая, Т. А. Говор // Рыб. хоз-во. Сер.: Болезни гидробионтов в аквакультуре : аналит. и реф. информ. — 2001. — Вып. 2. — С. 30–32.
2. Долгачева, И. М. Применение тиаминных ванн и субалина как меры по сокращению потерь рыбоводной продукции на лососевых рыбоводных заводах Северо-Запада / И. М. Долгачева // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре : сб. тез. докл. науч.-практ. конф., Москва, 21–22 нояб. 2000 г. / Рос. акад. с.-х. наук ; отв. ред. Н. А. Яременко. — М., 2000. — С. 57.



3. Бауэр, О. Н. Болезни прудовых рыб / О. Н. Бауэр, В. А. Мусселиус, Ю. А. Стрелков. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Лег. и пищевая пром-сть, 1981. — 319 с.
4. Антибиотики в объектах аквакультуры и их экологическая значимость. Обзор / Л. В. Шульгина [и др.] // Изв. ТИНРО. — 2015. — Т. 181. — С. 216–230.
5. Проблема экологической безопасности лечебных и профилактических мероприятий в рыбоводстве / Л. Н. Юхименко [и др.] // Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию Моск. рыбовод.-мелиорат. опыт. ст. и 25-летию ее реорганизации в ГНУ ВНИИР : в 3 т. / Всерос. науч.-исслед. ин-т ирригац. рыбоводства ; [отв. ред. Г. Е. Серветник]. — М., 2005. — Т. 2. — С. 344–345.
6. Юхименко, Л. Н. Бактериальные болезни рыб / Л. Н. Юхименко // Ихтиопатология : учебник / Н. А. Головина [и др.] ; под ред. Н. А. Головиной, О. Н. Бауера. — М., 2003. — Гл. 6. — С. 133–172.
7. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* / В. В. Смирнов [и др.] // Микробиол. журн. — 1993. — Т. 55, № 4. — С. 92–112.
8. Род *Bacillus* / Р. Беркли [и др.] // Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / Р. Беркли [и др.]. — М., 1997. — Т. 2 / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. — С. 567–568.
9. Методы общей бактериологии : учеб.-метод. пособие / Д. А. Васильев [и др.]. — Ульяновск : Ульян. ГСХА, 2003. — 130 с.
10. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб : утв. Госагропромом СССР 12.06.1986, № 432-5. — М., 1986. — 12 с.
11. Юхименко, Л. Н., Современное состояние проблемы аэромоноза рыб / Л. Н. Юхименко, Г. С. Койдан // Болезни рыб : информ. пакет. — М., 1997. — Вып. 2. — С. 1–9. — (Рыбное хозяйство. Сер.: Аквакультура / Всерос. науч.-исслед. и проект.-конструкт. ин-т экономики, информ. и автоматизир. систем упр.).
12. Временные рекомендации по выделению и идентификации аэромонад / Всесоюз. науч.-исслед. ин-т прудового рыб. хоз-ва ; разработ.: Л. Н. Юхименко, В. Ф. Викторова, Й. Фаркаш. — М. : [б. и.], 1987. — 14 с.
13. Методические указания по диагностике, профилактике и лечению бактериальных инфекций (аэромоноз, псевдомоноз) у растительноядных рыб : утв. Гл. упр. ветеринарии М-ва сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь 16.02.2005. — Минск, 2005. — 8 с.

Referents

1. Skurat E. K., Sivolotskaya V. A., Govor T. A. Probiotics for the prevention of bacterial infections in fish. *Rybnoe khozyaistvo. Seriya: Bolezni gidrobiontov v akvakul'ture* [Fisheries. Series: Diseases of Aquatic Organisms in Aquaculture], 2001, iss. 2, pp. 30–32 (in Russian).



2. Dolgacheva I. M. The use of thiamine baths and subalin as a measure to reduce the loss of fish products at salmon fish hatcheries of the North-West. *Problemy okhrany zdorov'ya ryb v akvakul'ture: sbornik tezisov dokladov nauchno-prakticheskoi konferentsii, Moskva, 21–22 noyabrya 2000 g.* [Problems of fish health in aquaculture: a collection of abstracts of scientific and practical conference reports, Moscow, November 21–22, 2000]. Moscow, 2000, p. 57 (in Russian).
3. Bauer O. N., Musselius V. A., Strelkov Yu. A. *Diseases of pond fishes*. 2nd ed. Moscow, Legkaya i pishchevaya promyshlennost' Publ., 1981. 319 p. (in Russian).
4. Shulgina L. V., Yakush E. V., Shulgin Yu. P., Shenderyuk V. V., Chukalova N. N., Baholdina L. P. Antibiotics in aquaculture and their ecological significance. A review. *Izvestiya TINRO*, 2015, vol. 18, pp. 216–228 (in Russian).
5. Yukhimenko L. N., Bychkova L. I., Gavrilin K. V., Trifonova E. S. The problem of ecological safety of therapeutic and preventive measures in fish farming. *Akvakul'tura i integrirovannye tekhnologii: problemy i vozmozhnosti: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 60-letiyu Moskovskoi rybovodno-meliorativnoi opytnoi stantsii i 25-letiyu ee reorganizatsii v GNU VNIIR = Aquaculture and integrated technologies: problems and possibilities: proceedings of the International scientific-practical conference, dedicated to the 60th anniversary of the Moscow fish-breeding and reclamation experimental station and the 25th anniversary of its reorganization into the VNIIR*. Moscow, 2005, vol. 2, pp. 344–345 (in Russian).
6. Yukhimenko L. N. Bacterial diseases of fish. *Ichthyopathology*, ed. Golovina N. A., Bauer O. N. Moscow, 2003, pp. 133–172 (in Russian).
7. Smirnov V. V., Reznik S. R., Vyunitskaya V. A., Sorokulova I. B., Samgorodskaya N. V., Tofan A. V. Modern ideas on mechanisms of treatment-prophylactic action of probiotics from bacteria *Bacillus* genus. *Mikrobiologichnyi zhurnal = Mikrobiologichny Zhurnal*, 1993, vol. 55, no. 4, pp. 92–112 (in Russian).
8. Berkeley R. (et al.). The genus *Bacillus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Moscow, 1997, pp. 567–568 (in Russian).
9. Vasil'ev D. A., Shcherbakov A. A., Karpunina L. V., Zolotukhin S. N., Shvidenko I. G. *Methods of general bacteriology*. Ulyanovsk, Ulyanovsk State Agricultural Academy, 2003. 130 p. (in Russian).
10. *Guidelines for the laboratory diagnosis of fish pseudomonoses: approved Gosagroprom of the USSR 06/12/1986, no. 432-5*. Moscow, 1986. 12 p. (in Russian).
11. Yukhimenko L. N., Koidan G. S. The current state of the problem of fish aeromonosis. *Bolezni ryb: informatsionnyi paket* [Fish diseases: information package]. Moscow, 1997, iss. 2, pp. 1–9 (in Russian).
12. Yukhimenko L. N., Viktorova V. F., Farkash I. *Temporary recommendations for the isolation and identification of aeromonads*. Moscow, 1987. 14 p. (in Russian).
13. *Guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of bacterial infections (aeromonosis, pseudomonosis) in herbivorous fish: approved by the Main Department of Veterinary Medicine of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus on February 16, 2005*. Minsk, 2005. 8 p. (in Russian).



Сведения об авторах

Максимьюк Евгения Владимировна — научный сотрудник, РУП «Институт рыбного хозяйства» РУП «Научно—практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» (ул. Стебенёва, 22, 220024, Минск, Республика Беларусь). E—mail: jenya_maksimjuk@mail.ru

Information about authors

Maksimiyuk Evgenia — Researcher, RUE “Fish Industry Institute” of the RUE “Scientific and Practical Center of Belarus National Academy of Sciences for Animal Husbandry” (220024, Minsk, st. Stebeneva, 22, Republic of Belarus). E-mail: jenya_maksimjuk@mail.ru